

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-040785

(43)Date of publication of application : 13.02.2003

(51)Int.Cl.

A61K 35/74  
A23L 1/28  
A23L 1/30  
A61K 31/716  
A61K 35/84  
A61P 31/00  
A61P 31/04  
A61P 43/00

(21)Application number : 2002-145675

(71)Applicant : COMBI CORP

(22)Date of filing : 21.05.2002

(72)Inventor : TAKEGAWA WAGON  
SUGA TATSUHIKO

(30)Priority

Priority number : 2001150643    Priority date : 21.05.2001    Priority country : JP

(54) INFECTION SUPPRESSING COMPOSITION AND FOOD AND DRINK CONTAINING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an infection suppressing composition exhibiting excellent infection suppressing effect on pathogens by oral administration and provide a food and drink containing the composition.

SOLUTION: A material containing  $\beta$ -glucan and a heat-treated cell of lactic acid producing bacteria are used as active components of the infection suppressing composition. Preferably, the amount of the  $\beta$ -glucan-containing material is 0.5-99.5 wt.% and that of the heat-treated cell of the lactic acid producing bacteria is 99.5-0.5 wt.%. The material containing  $\beta$ -glucan is prepared preferably from one or more materials selected e.g. from the fruit body of basidiomycetes such as *Agaricus blazei* Murill, the mycelium of the basidiomycete, yeast, bacteria, algae and lichen. The lactic acid producing bacteria is preferably *Lactobacillus* or *Bifidus* bacteria. The *Lactobacillus* is preferably *Lactococci*, especially *Enterococcus faecalis*.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-40785

(P2003-40785A)

(43) 公開日 平成15年2月13日 (2003.2.13)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 6 1 K 35/74		A 6 1 K 35/74	A 4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/28		A 2 3 L 1/28	A 4 C 0 8 6
	1/30	1/30	Z 4 C 0 8 7
A 6 1 K 31/716		A 6 1 K 31/716	Z 4 C 0 8 8
審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 8 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-145675(P2002-145675)  
(22) 出願日 平成14年5月21日 (2002.5.21)  
(31) 優先権主張番号 特願2001-150643(P2001-150643)  
(32) 優先日 平成13年5月21日 (2001.5.21)  
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 391003912  
コンビ株式会社  
東京都台東区元浅草2丁目6番7号  
(72) 発明者 武川 和琴  
埼玉県さいたま市西堀5-2-39 コンビ  
株式会社内  
(72) 発明者 菅 辰彦  
埼玉県さいたま市西堀5-2-39 コンビ  
株式会社内  
(74) 代理人 100086689  
弁理士 松井 茂

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 感染抑制組成物及びそれを含有する飲食品

(57) 【要約】

【課題】 経口摂取することにより、優れた病原菌等の感染抑制効果を示す感染抑制組成物及びそれを含有する飲食品を提供する。

【解決手段】 感染抑制組成物の有効成分として、 $\beta$ -グルカンを含む素材と乳酸産生菌の加熱処理菌体とを有効成分として含有させる。前記 $\beta$ -グルカンを含む素材を0.5~99.5質量%、前記乳酸産生菌の加熱処理菌体を99.5~0.5質量%含有することが好ましい。また、前記 $\beta$ -グルカンを含む素材は、例えば、アガリクス・ブラゼイ・ムリル等の担子菌の子実体、担子菌の菌糸体、酵母、細菌、藻類、地衣類から選ばれた少なくとも1種より調製されたものであることが好ましい。更に、前記乳酸産生菌は、乳酸菌及び／又はビフィズス菌であることが好ましい。更にまた、前記乳酸菌は乳酸球菌であることが好ましく、特に、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) であることがより好ましい。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】  $\beta$ -グルカンを含む素材と、乳酸産生菌の加熱処理菌体とを有効成分として含有することを特徴とする感染抑制組成物。

【請求項2】 前記 $\beta$ -グルカンを含む素材を0.5～99.5質量%、前記乳酸産生菌の加熱処理菌体を99.5～0.5質量%含有する、請求項1に記載の感染抑制組成物。

【請求項3】 前記 $\beta$ -グルカンを含む素材は、担子菌の子実体、担子菌の菌糸体、酵母、細菌、藻類、地衣類から選ばれた少なくとも1種より調製されたものである、請求項1又は2に記載の感染抑制組成物。

【請求項4】 前記担子菌は、アガリクス・ブラゼイ・ムリル (*Agaricus blazei* Murill)、メシマコブ、マイタケ、エノキタケ、ハナビラタケ、シイタケ、霊芝、ヤマブシタケ、アワビタケ、オオヒラタケ、カワラタケ、白樺タケ、白キクラゲ、梅寄生茸、タモギタケ、マツタケ、シメジ、エリンギ、ナメコタケ、フクロタケ、マンネンタケから選ばれたものである、請求項3に記載の感染抑制組成物。

【請求項5】 前記乳酸産生菌は、乳酸菌及び／又はビフィズス菌である、請求項1～4のいずれか一つに記載の感染抑制組成物。

【請求項6】 前記乳酸菌は、乳酸球菌である、請求項5に記載の感染抑制組成物。

【請求項7】 前記乳酸球菌は、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) である、請求項6に記載の感染抑制組成物。

【請求項8】 請求項1～7のいずれか一つに記載の感染抑制組成物を含有することを特徴とする飲食品。

【請求項9】 前記感染抑制組成物を1食分当たり0.01～10g含有する、請求項8に記載の飲食品。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、 $\beta$ -グルカンを含む素材と乳酸産生菌の加熱処理菌体とを有効成分として含有する感染抑制組成物及びそれを含有する飲食品に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 担子菌類ハラタケ科のキノコであるアガリクス・ブラゼイ・ムリル (*Agaricus blazei* Murill、日本名「カワリハラタケ」) は、ガン、アレルギー、糖尿、高血圧等の予防・改善効果を有することが知られており、例えば、抗腫瘍活性成分として、その子実体から酸性多糖体 (特開昭64-67194号公報)、中性多糖体 (特開昭64-67195号公報) 及び蛋白多糖体 (特開平2-78630号公報) が、菌糸体から蛋白多糖体 (特開昭61-47518号公報) が、更に菌糸体の培養濾液から蛋白多糖体 (特開昭61-47519号公報) がそれぞれ分画されている。

【0003】 アガリクス・ブラゼイ・ムリルは、健康食品素材として広く利用されており、例えば、特開2001-103927号公報には、アガリクス茸を加圧下、水性溶媒を用いて抽出し、該抽出物を50%エタノールで分別して得られるアガリクス茸エキスを配合した食用組成物が開示されている。

【0004】 特開2001-17130号公報には、アガリクス茸煎じ液に酢と蜂蜜を混合したことを特徴とするアガリクス含有健康飲料食品が開示されている。

【0005】 特開平11-32723号公報には、アガリクスブラゼイの菌糸体、子実体及びその混合物、又はこれらの培養残液をヘミセルラーゼが主体の酵素剤で分解処理し、そのときに得られる $\beta$ -グルカン類が多量に含まれる生理活性物質を主材とする健康食品が開示されている。

【0006】 また、乳酸菌やビフィズス菌等の乳酸産生菌も従来から健康食品として広く摂取されており、腸内フローラのバランスを改善し、腸内腐敗産物の低減、糞便性状の改善効果のほか、免疫賦活効果を有することが知られている。例えば、特開2001-48796号公報には、*Enterococcus faecalis* AD101菌株の死菌体を主成分とする免疫調整剤が開示されている。

【0007】 特開平10-29946号公報には、乳酸菌又はその処理物を有効成分とする、薬剤によって低下した液性免疫機能を回復する作用を有する液性免疫回復剤が開示されている。

【0008】 特開平6-80575号公報には、乳酸菌菌体及び／又は菌体含有物を有効成分として含有することを特徴とする経口免疫賦活剤が開示されている。

【0009】 特開平5-252900号公報には、乳酸菌菌体の細胞質画分及び／又は細胞質画分含有物を含有することを特徴とする免疫賦活組成物が開示されている。

## 【0010】

【発明が解決しようとする課題】 上記のように、アガリクス・ブラゼイ・ムリルや乳酸菌等は、健康食品として広く利用されているものの、それぞれを単独で摂取した場合の生理効果は充分満足できるものではなかった。

【0011】 したがって、本発明の目的は、経口摂取することにより、優れた病原菌等の感染抑制効果を示す感染抑制組成物及びそれを含有する飲食品を提供することにある。

## 【0012】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究した結果、 $\beta$ -グルカンを含む素材と乳酸産生菌の加熱処理菌体とを併用することにより、それらを単独で用いた場合に比べて非常に強く病原菌等の感染を抑制できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】 すなわち、本発明の感染抑制組成物は、 $\beta$

ーグルカンを含む素材と、乳酸産生菌の加熱処理菌体とを有効成分として含有することを特徴とする。

【0014】本発明の感染抑制組成物は、経口摂取することにより、 $\beta$ -グルカンによる免疫賦活活性効果と乳酸産生菌の加熱処理菌体による免疫賦活活性との相乗効果により、病原菌等の感染を強く抑制することができる。

【0015】本発明の感染抑制組成物は、前記 $\beta$ -グルカンを含む素材を0.5～99.5質量%、前記乳酸産生菌の加熱処理菌体を99.5～0.5質量%含有することが好ましい。この態様によれば、より効果的に病原菌等の感染を抑制できる感染抑制組成物を提供できる。

【0016】また、本発明の感染抑制組成物においては、前記 $\beta$ -グルカンを含む素材は、担子菌の子実体、担子菌の菌糸体、酵母、細菌、藻類、地衣類から選ばれた少なくとも1種より調製されたものであることが好ましい。この態様によれば、 $\beta$ -グルカンを簡単に調製することができる。

【0017】更に、本発明の感染抑制組成物においては、前記担子菌は、アガリクス・ブラゼイ・ムリル (*Agaricus blazei* Murill)、メシマコブ、マイタケ、エノキタケ、ハナビラタケ、シイタケ、霊芝、ヤマブシタケ、アワビタケ、オオヒラタケ、カワラタケ、白樺タケ、白キクラゲ、梅寄生茸、タモギタケ、マツタケ、シメジ、エリンギ、ナメコタケ、フクロタケ、マンネンタケから選ばれたものであることが好ましい。この態様によれば、 $\beta$ -グルカンを含む素材として、従来より食品として摂取されている担子菌から調製されたものを用いることにより、より安全な感染抑制組成物を提供できる。

【0018】更にまた、本発明の感染抑制組成物においては、前記乳酸産生菌は、乳酸菌及び／又はビフィズス菌であることが好ましい。この態様によれば、乳酸産生菌として、従来より食品として摂取されている乳酸菌やビフィズス菌の加熱処理菌体を用いることにより、より安全な感染抑制組成物を提供できる。

【0019】更にまた、本発明の感染抑制組成物においては、前記乳酸菌は乳酸球菌であることが好ましく、前記乳酸球菌はエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) であることが好ましい。これらの態様によれば、特に優れた感染抑制効果を有する感染抑制組成物を提供できる。

【0020】また、本発明の飲食品は、前記感染抑制組成物を含有することを特徴とする。本発明の飲食品は、 $\beta$ -グルカンを含む素材と、乳酸産生菌の加熱処理菌体とを有効成分として含有する感染抑制組成物を含有するので、該飲食品を摂取することにより、安全かつ効果的に病原菌等の感染を抑制することができる。

【0021】本発明の飲食品は、前記感染抑制組成物を

1食分当たり0.01～10g含有することが好ましい。この態様によれば、1食分の飲食品で充分な量の感染抑制組成物を摂取することができる。

【0022】本発明の感染抑制組成物による感染抑制効果の作用機序は、現在のところ明らかではないが、 $\beta$ -グルカンと乳酸菌の加熱処理菌体とを併用して摂取することにより、マクロファージ、NK細胞及びT細胞を中心とした細胞性免疫機構が活性化され、病原菌等の排除が効率よく行なわれるためであると考えられる。

【0023】

【発明の実施の形態】本発明において、 $\beta$ -グルカンとは、グルコースから構成される多糖類のうち、グルコースが $\beta$ 型の構造で結合したものをいい、具体的には $\beta$ -1,4グルカン(セルロース)、 $\beta$ -1,3グルカン、 $\beta$ -1,6グルカン等が挙げられる。

【0024】本発明において用いられる $\beta$ -グルカンを含む素材としては、上記のような $\beta$ -グルカンを含む、飲食品に用いることのできる素材であれば特に制限なく用いることができる。例えば、担子菌の子実体、担子菌の菌糸体、酵母、細菌、藻類、地衣類等の細胞壁等には $\beta$ -グルカンが多く含まれており、これらから調製されたものが好ましく用いられる。

【0025】上記担子菌としては、食用に適するものであれば特に制限なく用いることができるが、例えば、アガリクス・ブラゼイ・ムリル (*Agaricus blazei* Murill)、メシマコブ、マイタケ、エノキタケ、ハナビラタケ、シイタケ、霊芝、ヤマブシタケ、アワビタケ、オオヒラタケ、カワラタケ、白樺タケ、白キクラゲ、梅寄生茸、タモギタケ、マツタケ、シメジ、エリンギ、ナメコタケ、フクロタケ、マンネンタケ等が好ましく挙げられ、中でもアガリクス・ブラゼイ・ムリルが好ましい。これらの担子菌は、従来より食品として摂取されているものであり、容易に入手でき、安全性も非常に高い。

【0026】上記担子菌の子実体、担子菌の菌糸体、酵母、細菌、藻類、地衣類等から $\beta$ -グルカンを調製する方法は、特に制限はなく、熱水抽出、アルコール等の有機溶媒抽出、酵素分解等の公知の方法で行なうことができる。例えば、生あるいは乾燥したアガリクス・ブラゼイ・ムリルの子実体やアガリクス・ブラゼイ・ムリルの種菌を炭素源及び窒素源を含む培地で培養して得られる菌糸体培養物を、水、アルコール等の溶媒で抽出することにより調製することができる。具体的には、例えば、乾燥したアガリクス・ブラゼイ・ムリルの子実体の質量の約20倍量の水を加え、120℃で30分間抽出し、得られた抽出液を適宜濃縮、乾燥することにより得ることができる。

【0027】なお、上記のようにして得られる担子菌の子実体、担子菌の菌糸体、酵母、細菌、藻類、地衣類等からの抽出物は、通常、 $\beta$ -グルカンを1～50質量%含んでおり、そのまま用いてもよく、必要に応じて更に

精製してから用いてもよい。また、上記担子菌の子実体、担子菌の菌糸体、酵母等からの抽出物は市販されており、これらを用いることもできる。

【0028】また、本発明において乳酸産生菌の加熱処理菌体とは、乳酸菌、ビフィズス菌等の乳酸産生菌を加熱処理して得られる死菌体であり、例えば、以下のようにして得ることができる。

【0029】乳酸産生菌を、ロゴサ培地にて30～45℃、12～72時間培養した後、遠心分離等の適当な手段で菌体を回収する。回収した菌体を、水洗、濃縮し、この濃縮菌体懸濁液を80～115℃、30分～3秒間加熱処理した後、噴霧乾燥、凍結乾燥等の適当な手段により乾燥して得ることができる。

【0030】上記乳酸菌としては、例えば、*Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium*、*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus lactis*、*Lactobacillus herveticus*、*Streptococcus thermophilus*等が挙げられる。また、上記ビフィズス菌としては、例えば、*Bifidobacterium Longum*、*Bifidobacterium breve*等が挙げられる。

【0031】本発明においては、より強い免疫賦活活性を有するエンテロコッカス・フェカリス*Enterococcus faecalis* (ATCC 19433、ATCC 14508、ATCC 23655等) が特に好ましく用いられる。*Enterococcus faecalis*の加熱処理菌体は、例えば「EFパワー」、「EF-2001」（いずれも商品名、コンビ株式会社製）、「FK-23」（商品名、ニチニチ製薬製）等として市販されており、これらを用いてもよい。

【0032】本発明の感染抑制組成物は、上記β-グルカンを含む素材を0.5～99.5質量%（β-グルカン換算で0.5～50質量%）、上記乳酸産生菌の加熱処理菌体を99.5～0.5質量%含むことが好ましく、β-グルカンを含む素材を10～90質量%（β-グルカン換算で5～50質量%）、乳酸産生菌の加熱処理菌体を90～10質量%含むことがより好ましい。各有効成分が上記範囲外であると相乗的な感染抑制効果が得られないため好ましくない。

【0033】本発明の感染抑制組成物は、上記の基本的成分の他に、賦形剤、甘味料、酸味料、ビタミン類、ミネラル類等を含むことができる。また、その形態は特に制限はなく、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、液体等、その使用目的に合わせて適宜選択できる。

【0034】本発明の感染抑制組成物の有効摂取量は、成人1日当たり0.01～10gが好ましく、0.05

～2gがより好ましい。

【0035】本発明の感染抑制組成物は様々な飲食品、例えば、飲料、ゼリー、キャンディー、ガム、レトルト食品、インスタント食品等に添加することができる。上記感染抑制組成物の添加量は、1食分当たり0.01～10gが好ましく、0.05～2gがより好ましい。感染抑制組成物の添加量が0.01g未満であると摂取しても十分な感染抑制効果が得られず、10g超であるとコスト的に高くなりすぎるため好ましくない。

【0036】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。なお、以下の例においては、アガリクス・ブラゼイ・ムリルの子実体の抽出物として商品名「仙生露」

（協和エンジニアリング社製）、乳酸球菌（*Enterococcus faecalis*）の加熱処理菌体として商品名「EF-2001」（コンビ株式会社製）を用いた。

【0037】試験例（乳酸球菌の加熱処理菌体の急性経口毒性試験）

OECD Guidelines for the Chemicals 401(1981)に準拠し、マウスを用いた急性経口毒性試験を行った。

【0038】具体的には、乳酸球菌の加熱処理菌体を精製水に懸濁して、試験液（250mg/mL）を調製した。

【0039】4週齢のICR系マウス（雌雄各20匹ずつ、日本エスエルシー株式会社より購入）を約1週間の予備飼育を行なった後、試験群（雌雄各10匹ずつ）とコントロール群（雌雄各10匹ずつ）に分け、試験群には、上記試験液を乳酸球菌の加熱処理菌体換算で5,000mg/kg体重となるように胃ゾンデを用いて強制単回経口投与した。また、コントロール群には精製水（雄：0.7mL、雌：0.6mL）を同様にして投与し、室温23±2℃、照明時間12時間/日に設定した飼育室で飼育した。なお、試験期間中、水と飼料（商品名「マウス、ラット用固形飼料；ラボMRストック」、日本農産工業株式会社製）は自由に摂取させた。

【0040】投与後、1日1回の観察（観察期間14日間）を行なったが、いずれの群においても死亡例は見られなかった。そして、観察期間終了時に全てのマウスを剖検したところ、主要臓器に異常は見られなかった。また、投与後7、14日に体重を測定し、t-検定により有意水準5%で群間の比較を行なった。その結果を表1に示す。

【0041】

【表1】

	体重 (g)					
	投与前		投与後7日		投与後14日	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
コントロール群	30.7±1.2	26.7±1.5	34.9±1.4	29.2±1.9	37.3±1.9	31.0±1.8
試験群	30.7±1.3	27.0±1.4	35.5±2.0	29.2±1.7	38.3±2.7	31.3±1.9

体重は平均値±標準偏差 (n=10) で表す。

【0042】表1から、雌雄ともに各群間で体重増加に差は見られなかった。以上の結果から、乳酸球菌の加熱処理菌体のマウスにおける単回経口投与によるLD50値は5,000mg/kg体重以上であると考えられた。

#### 【0043】実施例1

7週齢のBALB/cマウス（雌）40匹（日本クレア（株）より購入）を4群（各群10匹）に分け、試験群にはアガリクス・ブラゼイ・ムリルの子実体抽出エキス（乾燥子実体として0.3mg/匹）と乳酸球菌の加熱処理菌体（10μg/匹）との混合物、比較群1には乳酸球菌加熱処理菌体（20μg/匹）、比較群2にはアガリクス・ブラゼイ・ムリルの子実体抽出エキス（乾燥子実体として0.6mg/匹）、コントロール群にはPBS（0.2mL/匹）をそれぞれ胃ゾンデで1週間毎日1回強制経口投与した。

【0044】その後、リステリア菌（*Listeria monocytogenes*）を $2 \times 10^5$ CFU/匹となるようにマウスの腹腔内に注射し、その後の各群のマウスの生存率を観察した。なお、試験期間中、水及び飼料（商品名「粉末飼料CE-2」、日本クレア製）は自由摂取とした。

【0045】その結果を図1に示す。図1から、試験群、比較群1、2はコントロール群に比べて非常に高い生存率を示すことが分かる。特に、試験群のマウスは1匹も死亡しておらず、リステリア菌の感染・増殖を抑制していることが分かる。

#### 【0046】実施例2

実施例1と同様にして、試験開始1週間前から毎日1回、各群のマウスに試験サンプルを強制経口投与した後、リステリア菌を感染させた。その後、マウスの脾臓を採取し、脾臓に感染したリステリア菌数の変化を測定した。具体的には、感染後、1、3、5、7日目に脾臓を採取し、この脾臓をすりつぶしてPBS中に懸濁し、この懸濁液を段階希釈して「リステリア増菌培地」（商品名、MERCK社製）に移して培養（25℃、48時間）し、出現したコロニーの数を測定した。その結果を図2に示す。

【0047】図2から、感染後3日目以降ではコントロール群ではリステリア菌数が増えているのに対して、試験群、比較群1、2では減少していることが分かる。特に、試験群ではその減少の割合が大きいことが分かる。

【0048】これらの結果から、アガリクス・ブラゼイ・ムリルの子実体抽出エキスと乳酸球菌の加熱処理菌体とを併用して経口摂取することにより、それぞれを単独で摂取した場合に比べてより優れた感染抑制効果を示すことが分かる。

#### 【0049】実施例3

アガリクス・ブラゼイ・ムリルの子実体抽出エキスと乳酸球菌の加熱処理菌体とを併用して経口摂取することによる感染抑制効果の作用機序について、以下の方法により調べた。

#### 【0050】（1）CD3陽性 $\alpha\beta$ 型T細胞の表面抗原解析

検疫・検収の終了後、1週間予備飼育を行ったBALB/cマウス（雌、7週齢、日本チャールズリバー（株）より購入）を2群（1群3匹）に分け、試験群にはアガリクス・ブラゼイ・ムリルの子実体抽出エキス（乾燥子実体として0.2mg/匹）と乳酸球菌の加熱処理菌体（20μg/匹）との混合物（0.2mL/匹）、コントロール群にはPBS（0.2mL/匹）を、それぞれ胃ゾンデで1日1回1週間連続経口投与した後、リステリア菌（*Listeria monocytogenes*）を $1.4 \times 10^4$ CFU/匹となるようにマウスの尾静脈内に注射した。なお、飼育期間中、水及び飼料（商品名「粉末飼料CE-2」、日本クレア製）は自由摂取とした。

【0051】リステリア菌接種後5日目に各群のマウスを屠殺して腸管膜リンパ節を採取した。この腸管膜リンパ節をすりガラスで挟んで、10%FBS含有RPMI-1640培養液（商品名、Invitrogen製）に懸濁させて洗浄し、ステンレスメッシュにて余分な組織片を除去して試験群及びコントロール群の腸管膜リンパ節細胞（以下、MLNという）をそれぞれ調製した。

【0052】各MLNを、10%FBS含有RPMI-1640培養液中に $5 \times 10^5$ 個/mLとなるように懸濁して、6穴プレート（Corning Costar Co. 製）に1ウエル当たり1mLずつまいた。そして、Stimulatorとして、1ウエル当たりに、マイトマイシンC（協和醗酵工業製）処理した、未処理BALB/cマウス由来の脾細胞（ $5 \times 10^5$ 個）及びリステリア菌加熱死菌体（ $1.0 \times 10^6$ CFU）を加えて混合し、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で48時間培養した。なお、上記未処理マウスとは、被験物質の投与及び菌接種を行っていないマウスを意味する。

【0053】そして、各MLNを下記の3種類の標識抗体（抗体は全てBecton Dickinson PharMingen社より購入）を用いて染色し、細胞表面抗原の解析を行なった。

【0054】①Cy-chrome (Cy) 標識抗CD3ε mAb/FITC標識抗TCRαβ mAb/PE標識抗CD4 mAb/biotin標識抗CD8 mAb  
②Cy標識抗CD3ε mAb/FITC標識抗TCRαβ mAb/PE標識抗CD69 mAb/biotin標識抗CD8 mAb  
③Cy標識抗CD3ε mAb/FITC標識抗TCRαβ mAb/PE標識抗CD122 mAb/biotin標識抗CD8 mAb

すなわち、 $1.0 \times 10^5$ 個に調製したMLN浮遊液に、上記①に示す標識抗体を5μL添加し、4℃で45分間インキュベートした。その後、5%FBS含有Hank's緩衝液で2回洗浄し、SA-RED613（商品名、Invitrogen社製）を5μL添加し、4℃で45分間インキュベートして、5%FBS含有Hank's緩衝液で3回洗浄した。そして、フローサイトメータ（型式「Epics XL」、Beckman Coulter Inc. 製）によりMLNの表面抗原を解析し、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>細胞に対するCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の割合を求め、

CD8陽性率を比較した。その結果を表2に示す。

【0055】

【表2】

	% of total CD3 <sup>+</sup> αβTCR <sup>+</sup> cells		
	MLN (mean±SD)		Ratio (B/A)
	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (A)	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (B)	
コントロール群	29.1±1.3	26.4±1.2	0.9±0.3
試験群	20.4±1.2	43.7±1.2	2.1±0.3

【0056】表2から、試験群のCD8陽性率はコントロール群に比べて約2倍高く、アガリクス・ブラゼイ・ムリルの子実体抽出エキスと乳酸球菌の加熱処理菌体とを摂取することにより、CD8陽性率が高くなることが分かる。

【0057】また、CD8陽性T細胞の活性化の有無をCD69（初期活性マーカー）及びCD122（IL-2受容体β鎖）を指標に検討した。すなわち、上記②、③に示す標識抗体を用いて、上記と同様の方法で細胞の表面抗原を解析した。その結果を表3に示す。

【0058】

【表3】

	% of total CD3 <sup>+</sup> αβTCR <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> cells	
	MLN (mean±SD)	
	CD69 <sup>+</sup>	CD122 <sup>+</sup>
コントロール群	38.6±1.2	35.5±1.8
試験群	42.2±1.2	43.8±1.4

【0059】表3から、試験群のCD69及びCD122陽性率はコントロール群に比べて高く、アガリクス・ブラゼイ・ムリルの子実体抽出エキスと乳酸球菌の加熱処理菌体とを摂取することにより、CD8陽性T細胞の活性化が促進されることが示唆された。

【0060】（2）サイトカイン産生量

上記と同様にして、コントロール群及び試験群のMLNを調製し、Stimulatorを加えて37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で48時間培養した。

【0061】培養終了後、培養上清を回収して、培養上清中のサイトカイン量（IL-2、IL-10、IL-12、IFN-γ）をELISA法で測定した。なお、IL-2、IL-12、IFN-γの測定はEndogen Inc.より購入した測定キットを用い、IL-10の測定はANALYZA TECHNE Co.より購入した測定キットを用いた。その結果を図3に示す。

【0062】図3から、試験群はT helper 1 (Th-1) 型サイトカインであるIFN-γ及びIL-12の産生量が非常に高く、T helper 2 (Th-2) 型サイトカインであるIL-10の産生量は非常に低いことが分かる。

【0063】また、サイトカイン特異的mRNAの発現量をRT-PCR法により調べたところ、試験群においてTh-1型サイトカインであるIL-12、IFN-γ及

びTNF-αのmRNAの発現量が増強されていることが分かった。一方、Th-2型サイトカインであるIL-10のmRNAの発現量に差異は認められなかった。

【0064】一般的に、リステリア菌等の細胞内寄生細菌に感染した生体内ではマクロファージやNK細胞が活性化され、それぞれIL-12及びIFN-γを産生することが知られている。これらのサイトカインはさらに細菌抗原特異的CD8陽性T細胞を活性化し、その結果として細胞障害活性（CTL）を有するCD8陽性T細胞による菌排除が行なわれる。また、T細胞によって産生されるTNF-αは、好中球やマクロファージ等の食細胞を感染局所に集合させる作用を有する。

【0065】すなわち、上記の各結果から、アガリクス・ブラゼイ・ムリルの子実体エキスと乳酸球菌とを併用して投与することにより、マクロファージやNK細胞の活性化がより促進されてIL-12及びIFN-γ等の産生量が増大した結果、リステリア菌特異的CD8陽性細胞の活性化も促進され、コントロール群よりも菌排除が早まったものと考えられる。

【0066】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、β-グルカンを含む素材と、乳酸産生菌の加熱処理菌体とを有効成分として含有させることにより、優れた感染抑制効果を有する組成物を提供できる。また、本発明の感染抑制組成物を飲食品に添加することにより、病原菌等の感染を予防する飲食品を提供できる。

【0067】本発明の感染抑制組成物の有効成分は食品由来であるので安全性が高く、この感染抑制組成物を摂取することにより、細胞性免疫を中心とした生体防御機構の活性化が促進され、病原菌等の感染予防効果が期待される。

【図面の簡単な説明】

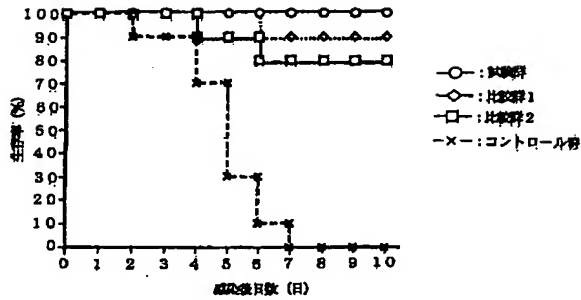
【図1】 リステリア菌感染後のマウスの生存率を示す図表である。

【図2】 リステリア菌感染後のマウスの脾臓中におけるリステリア菌数の測定結果を示す図表である。

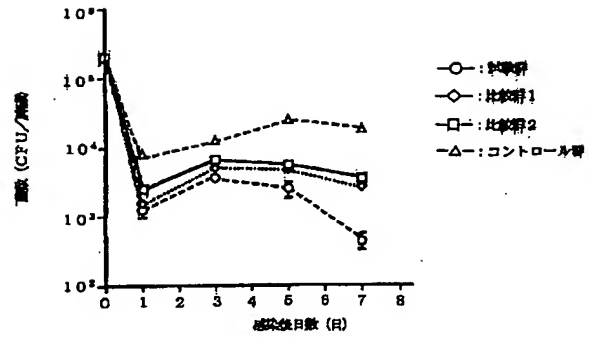
【図3】 腸管膜リンパ節細胞（MLN）培養液上清中のサイトカイン量（IL-2、IL-10、IL-12、IFN-γ）をELISA法で測定した結果を示す図表である。



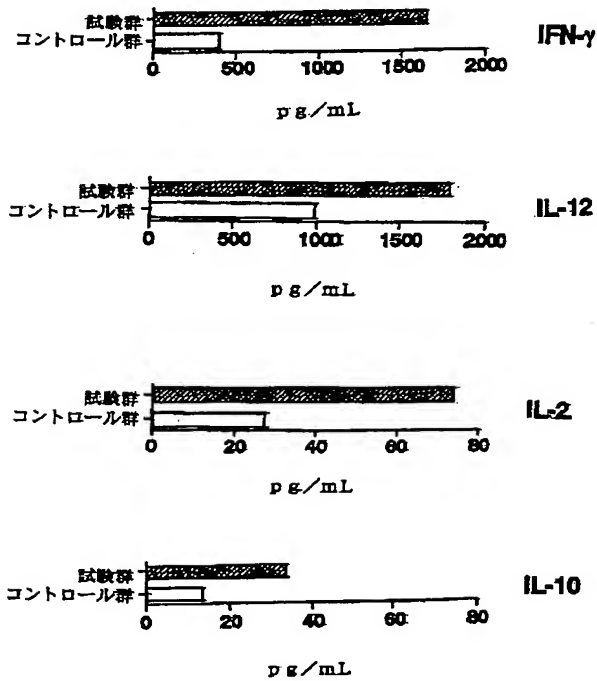
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テ-マ-コ-ド (参考)

A 6 1 K 35/84

A 6 1 K 35/84

A

A 6 1 P 31/00

A 6 1 P 31/00

31/04

31/04

43/00

1 2 1

43/00

1 2 1

Fターム(参考) 4B018 LB01 LB02 LB08 MD81 MD82  
MD83 MD84 MD85 MD86 MD89  
ME09  
4C086 AA01 AA02 EA20 MA02 MA04  
MA05 MA16 MA35 MA37 MA41  
MA43 MA52 NA05 NA14 ZB32  
ZB35 ZC75  
4C087 AA01 AA02 BC56 BC59 BC61  
BC62 CA09 MA02 MA16 MA35  
MA37 MA41 MA43 MA52 NA05  
NA14 ZB32 ZB35 ZC75  
4C088 AC16 MA01 MA16 MA35 MA37  
MA41 MA43 MA52 NA05 NA14  
ZB32 ZB35 ZC75